

Respon Antera *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. Carnaval pada Medium dengan Berbagai Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh

Response of Anthurium andreanum Linden ex André cv. Carnaval Anther in Medium with Various Combinations of Plant Growth Regulator Concentration

Budi Winarto^{1*} dan Nurhayati A. Mattjik¹

Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
(Bogor Agricultural University), Indonesia

Diterima 22 Februari 2009/Disetujui 18 Juni 2009

ABSTRACT

Anther culture is one of technological breakthrough in producing homozygous lines, which is an important genetic resource in plant breeding programs. Response of anther in various regeneration media is one of important basic information in developing anther culture method. The objective of this research was to investigate callus formation and evaluate the potential of using this cultivar in developing anther culture of anthurium. Anthers, yellow and reddish callus derived from anther culture of A. andreanum cv. Carnaval were used in the study. Eight regeneration media i.e. MMS + (1) 0.5 mg/l TDZ + 0.01 mg/l NAA,(2) 0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l NAA, (3) 1.0 mg/l TDZ + 0.01 mg/l NAA, (4) 1.5 mg/l TDZ + 0.02 mg/l NAA, (5) 1.0 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l TDZ + 0.01 mg/l NAA,(6) 0.75 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l TDZ + 0.05 mg/l NAA, (7) 0.75 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l TDZ + 1.0 mg/l BAP + 0.01 mg/l NAA, and (8) 0.25 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l TDZ + 0.75 mg/l BAP +0.02 mg/l NAA for yellow and reddish callus were investigated in this research. Factorial experiment was arranged in randomized complete block design with four replications. Results of this study indicated that callus formation was startedat ± 2.7 month after culture and observable by 3.5 month after culture. Average number of callus per anther was 3.6 per replication. Reddish callus grew faster than the yellow one. The callus cultured in MMS with 0.02 mg/l NAA gave high results of shoot initiation time , number of shoots primordia per explant, and average height of shoot primordial i.e. 8.5week, 10.8, and 0.78 cm respectively.

Keywords: Anther culture, callus formation and regeneration, and medium.

PENDAHULUAN

Kultur antera saat ini telah menjadi salah satu teknik kultur jaringan yang digunakan secara rutin untuk menghasilkan tanaman homozigot murni atau haploid ganda yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai tujuan. Metode ini telah diaplikasikan secara luas pada tanaman sereal, beberapa tanaman sayur dan buah dengan tingkat keberhasilan yang bervariasi (Maluszynski *et al.*, 2003). Teknik ini juga telah berhasil dikembangkan pada lili, bunga matahari, dan anyelir (Han *et al.*, 1997; Saji dan Sujatha, 1998; Fu *et al.*, 2008), namun aplikasinya pada tanaman anthurium dan famili Araceae masih sangat terbatas.

Aplikasi dan keberhasilan teknik kultur antera dipengaruhi oleh genotipe tanaman donor, kondisi fisiologinya, umur antera dan tahap perkembangan mikrospora yang ada di dalamnya, tindakan prakultur, perlakuan dingin, kondisi kultur antera, faktor-faktor

fisik (suhu, cahaya, pH, kepadatan antera) dan faktor-faktor kimia (media kultur, gula, hormon) (Maluszynski *et al.*, 2003). Faktor-faktor tersebut umumnya saling terkait dan berpengaruh antara satu dengan yang lain, walaupun tidak semua faktor tersebut memiliki pengaruh yang dominan.

Inisiasi dan pengembangan kultur antera anthurium telah dilakukan oleh Rachmawati (2005) serta Winarto dan Rachmawati (2007). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa: (1) *Anthurium andreanum* Linden ex Andre c.v Tropical baik digunakan sebagai tanaman model, (2) antera responsif diisolasi dari daerah transisi pada spadik yang 50% pistilnya reseptif, (3) terdapat dua jenis kalus yang berbeda, yang dihasilkan dari kultur antera, (4) modifikasi medium Murashige dan Miller Syngonium (MMS) yang mengandung 1.5 mg/l TDZ, 0.75 mg/l BAP dan 0.02 mg/l NAA merupakan medium optimal untuk induksi dan regenerasi kalus, khususnya pada

* Penulis untuk korespondensi.
E-mail: ya_nuriwinarto@yahoo.com. Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang, Pacet-Cianjur Po Box 8 Sindanglaya, Pacet-Cianjur 43253.

kultivar Tropical. Keberhasilan ini memberi motivasi bagi pengembangan dan aplikasinya untuk kultivar yang lain.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan mengevaluasi respons pembentukan dan regenerasi kalus hasil kultur antera anthurium pada media regenerasi dengan kombinasi konsentrasi hormon yang berbeda. Diduga data awal pembentukan kalus ditemukan dan minimal terdapat satu medium regenerasi dengan kombinasi dan konsentrasi hormon yang sesuai untuk kultur antera anthurium kultivar Carnaval. Diakhir penelitian diharapkan akan diperoleh kalus dan medium regenerasi dengan kombinasi konsentrasi hormon yang sesuai untuk pembentukan dan regenerasi kalus.

BAHAN DAN METODE

Spadik *Anthurium andreanum* Linden ex André cv. Carnaval yang 50% pistilnya reseptif, kalus kemerahan dan kuning hasil kultur antera, serta modifikasi medium Murashige dan Miller Syngonium (MMS) digunakan dalam penelitian ini. Spadik disterilkan secara bertahap seperti yang didiskripsikan oleh Winarto dan Rachmawati (2007). Antera diisolasi secara langsung dari daerah transisi spadik, antera dipotong pada bagian ujungnya, kemudian ditanam dalam media regenerasi perlakuan. Jumlah mikrospora per antera dihitung menggunakan *haemocytometer*, sedangkan viabilitas mikrospora diuji menggunakan metode pewarnaan dengan aceto-carmin. Jumlah dan

viabilitas mikrospora digunakan sebagai data pendukung.

Pembentukan kalus

Kemampuan pembentukan kalus dilakukan dengan cara mengkulturkan antera pada medium semi padat MMS-0 (MMS + 0.5 mg/l TDZ + 0.01 mg/l NAA). Percobaan ini diulang lima kali. Tiap ulangan terdapat 10 botol kultur dimana tiap botol berisi 5 antera. Antera yang dikultur selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap selama 2.5 bulan. Selanjutnya kultur dipindahkan pada inkubasi terang dengan 12 jam fotoperiode di bawah lampu fluoresen dengan 12-13 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$. Pengamatan dilakukan secara periodik satu minggu sekali sampai terbentuk kalus dan didokumentasikan. Peubah yang diamati dalam percobaan ini adalah: 1) persentase kontaminasi 2) potensi tumbuh (PTA, %), 3) lama waktu pembentukan kalus (bulan), dan 4) persentase pembentukan kalus Data yang terkumpul pada tahap ini disajikan dalam rata-rata yang diikuti dengan nilai standar deviasinya.

Regenerasi kalus

Dua jenis kalus yang dihasilkan pada tahap induksi yaitu: kalus kemerahan (JK-1) dan kuning (JK-2) digunakan sebagai sumber eksplan yang diuji. Masing-masing kalus dikuturkan kedalam delapan jenis media regenerasi (MR-1 s/d MR-8, Tabel 1).

Tabel 1. Variasi kombinasi dan konsentrasi hormon

Kode medium	Jenis hormon (mg/l)			
	2.4-D	NAA	TDZ	BAP
MR-0 (Kontrol)				
MR-1	-	0.01	0.5	-
MR-2	-	0.05	0.5	-
MR-3	-	0.01	1.0	-
MR-4	-	0.02	1.5	-
MR-5	1.0	0.01	1.5	-
MR-6	0.75	0.05	2.0	-
MR-7	0.75	0.01	1.0	1.0

Percobaan dilaksanakan secara faktorial menggunakan rancangan acak kelompok dengan empat ulangan, masing-masing terdiri atas lima botol yang berisi 5 antera untuk tiap botolnya.

Peubah yang diamati dalam percobaan ini adalah: 1) lama waktu inisiasi bakal tunas (minggu setelah kultur, MSK), 2) jumlah bakal tunas, 3) tinggi bakal tunas (cm), 4) jumlah tunas, dan 5) tinggi tunas (cm).

Data yang terkumpul dalam percobaan regenerasi kalus diolah menggunakan program SAS Release Windows 6.12. Apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan, angka rataaan perlakuan diuji lanjut menggunakan Uji Wilayah Berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.

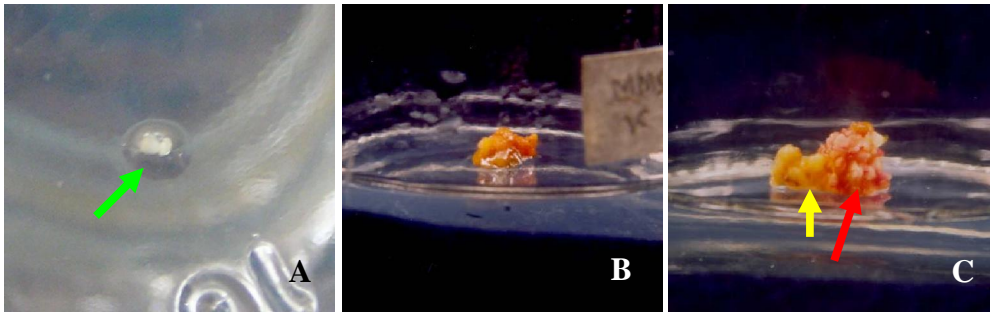
HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi kalus

Antera yang dikulturkan pada medium, sebagian besar terkontaminasi dengan bakteri. Kontaminasi berkisar antara 50-70% dengan nilai rata-rata 61%. Kontaminasi bakteri tersebut mulai terlihat 24 sampai dengan 48 jam setelah kultur antera. Di sekitar antera terlihat warna putih tipis dan semakin menebal seiring waktu inkubasi. Bakteri penyebab kontaminasi tersebut diketahui sebagai *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* (Norman dan Alvarez, 1994) atau *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Duffy, 2000). Bakteri tersebut merupakan laten kontaminan, menempati sel-sel parenkim dan ruang antar sel pada seluruh jaringan tanaman (Gunson dan Spencer-Philips, 1994). Kerusakan jaringan dan ketersediaan asam amino seperti methionin dan asam glutamat menjadi pemicu

aktivitas pertumbuhan bakteri (Norman dan Alvarez, 1994).

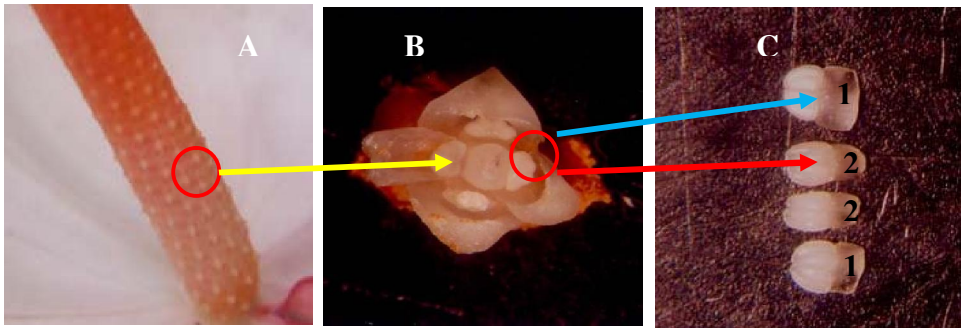
Potensi tumbuh antera berkisar antara 30-50% dengan nilai rata-rata 39%. Kalus mulai terbentuk 1 bulan setelah kultur. Kalus terlihat jelas saat berumur 2.0-3.0 bulan (Gambar 1A). Kalus terus bertumbuh dan perbedaan warna kalus mulai terlihat saat berumur 3.5-4.5 bulan (Gambar 1B). Dua warna kalus yang berbeda makin jelas pada umur lebih dari 5.0 bulan (Gambar 1C), yaitukemerahan dan kuning. Hasil tersebut sedikit berbeda dengan yang ditemukan pada kultur antera anthurium kultivar Tropical, yaitu hijau dan kuning (Rachmawati, 2005). Kalus kemerahan tumbuh lebih cepat dibanding kalus kuning. Jumlah antera yang berhasil membentuk kalus berkisar antara 2-5 antera dengan nilai rata-rata 3.6 antera per perlakuan. Hasil ini menjadi indikator awal adanya potensi antera kultivar Carnaval dalam pengembangan kultur antera anthurium.



Gambar 1. Pertumbuhan antera kultivar Carnaval pada medium MMS-0 pada umur 2.5 bulan (A), 4.5 bulan (B) dan 6 bulan (C). C-Kalus berbeda warna setelah 6 bulan kultur. Panah kuning kalus kuning, panah merah kalus merah.

Antera lebar-pipih dan kecil-tebal juga terdapat pada kultivar Carnaval (Gambar 2C). Jumlah rata-rata mikrospora pada antera pipih-lebar adalah 43.560 mikrospora per antera, sementara yang tebal-kecil adalah 49.450 mikrospora per antera. Viabilitas mikrospora berkisar 35.2 – 56.4% dengan nilai rata-rata

47.8%. Ini berarti hanya sekitar 22.229 mikrospora dalam setiap antera memiliki potensi untuk diinduksi membentuk kalus dan/atau embrio. Hasil yang hampir sama dilaporkan pada kultivar Tropical (Winarto dan Rachmawati, 2007).



Gambar 2. Posisi dan bentuk antera pada bunga anthurium kultivar Carnaval. A-Spadik B-Posisi antera pada bunga anthurium, C-Bentuk antera, 1-pipih lebar, 2-tebal kecil

Regenerasi kalus

Dua jenis kalus dan media regenerasi yang diuji ternyata memberikan pengaruh yang nyata terhadap daya regenerasi kultur anthera. JK-1 memiliki kemampuan regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan JK-2. JK tersebut memiliki waktu muncul bakal tunas yang lebih cepat, yaitu 10.4 MSK dengan jumlah bakal tunas 6.4 buah bakal tunas per eksplan dan tinggi bakal tunas 0.45 cm. Sedangkan MR-7 merupakan media regenerasi terbaik dengan waktu muncul bakal tunas yang tercepat, yaitu 10.3 MSK, meskipun tidak berbeda nyata dengan MR-3 yaitu 10.5 MSK. MR-3 dan MR-7 menstimulasi pembentukan bakal tunas terbanyak mencapai 7.4 bakal tunas per eksplan dan berbeda nyata dibandingkan dengan media regenerasi yang lain. MR-7

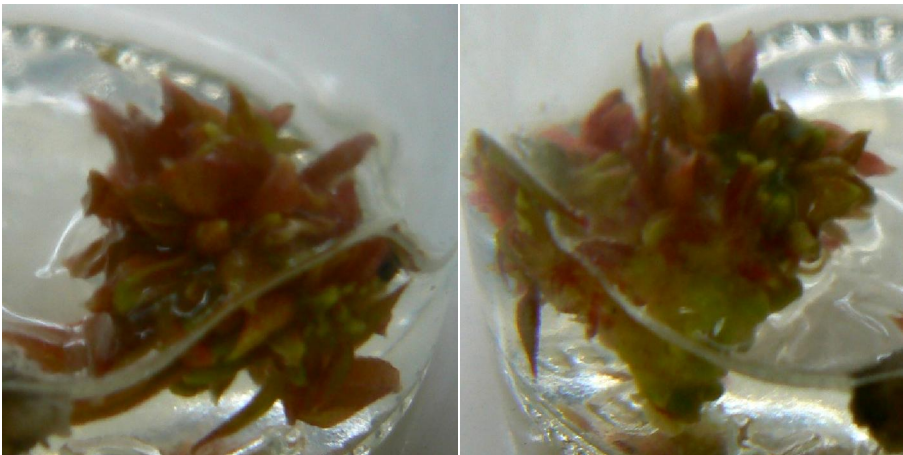
menginduksi pertumbuhan bakal tunas mencapai 0.68 cm, diikuti oleh MR-3 dengan 0.60 cm.

Pada pengaruh interaksi, JK-1 yang ditanam pada MR-7 dan MR-3 merupakan kombinasi perlakuan yang sesuai untuk kultur anthera Carnaval. JK-1 yang dikultur pada MR-7 menginduksi pembentukan bakal tunas dalam waktu tercepat yaitu 8.3 MSK, dengan jumlah mencapai 10.3 bakal tunas per eksplan dan tinggi bakal tunas 0.78 cm. Sedangkan JK-1 yang dikultur pada MR-3 menginduksi pembentukan bakal tunas dalam waktu 8.5 MSK dengan jumlah mencapai 10.8 bakal tunas per eksplan dan tinggi 0.70 cm. Hasil pada kedua kombinasi tersebut tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata dibandingkan dengan kombinasi yang lain (Tabel 2; Gambar 3). Hasil yang hampir sama ditemukan pada JK-2 yang dikombinasikan dengan MR-3 dan MR-7.

Tabel 2. Pengaruh interaksi antara jenis kalus dan media regenerasi terhadap waktu muncul bakal tunas, jumlah bakal tunas dan tinggi bakal tunas

Jenis media	Waktu muncul bakal tunas (MSK)		Jumlah bakal tunas		Tinggi bakal tunas (cm)	
	Kalus merah	Kalus kuning	Kalus merah	Kalus kuning	Kalus merah	Kalus kuning
MR-0	10.0 b	13.2 abc	5.5 cd	2.5 ab	0.38 b	0.20 b
MR-1	12.0 a	14.5 a	3.5 e	1.3 d	0.28 b	0.18 b
MR-2	10.7 ab	13.8 ab	5.0 d	2.8 c	0.43 b	0.23 b
MR-3	8.5 c	12.8 bc	10.8 a	4.0 ab	0.70 b	0.50 a
MR-4	11.8 a	14.3 a	2.8 e	1.3 d	0.28 b	0.20 b
MR-5	11.3 ab	13.2 abc	6.3 bc	2.8 c	0.32 b	0.28 b
MR-6	10.7 ab	12.8 bc	7.2 b	3.3 bc	0.45 b	0.30 b
MR-7	8.3 c	12.3 c	10.3 a	4.5 a	0.78 a	0.58 a
Koefisien variasi (CV, %)	8.93	5.83	12.65	20.43	18.51	21.97

Angka rataaan yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Wilayah Berganda Duncan pada taraf kepercayaan 5%.



Gambar 3. Kalus kemerahan yang tumbuh pada MR-3 (A) dan MR-7 (B) pada umur ± 3 bulan setelah kultur.

Dua jenis kalus hasil kultur antera memiliki kemampuan tumbuh dan regenerasi yang berbeda. Kalus kemerahan yang tumbuh lebih cepat diduga teregenerasi dari jaringan penghubung atau dinding antera, sementara kalus kuning berasal dari sel-sel mikropsora. Pertumbuhan kalus yang cepat umumnya menyebabkan terjadinya variasi morfologi dan ploidi pada tunas/plantlet yang dihasilkan (Han *et al.*, 1997; Mohan-Jain, 2001; Rimberia *et al.*, 2006; Ockendon, 2008). Variasi ploidi eksplan/plantlet yaitu haploid, diploid, triploid; variasi respon pertumbuhan kalus juga dilaporkan pada kultivar Tropical (Rachmawati., 2005). Seguí-Simarro dan Nuez (2008) melaporkan bahwa variasi ploidi pada tanaman hasil kultur antera ini dipengaruhi oleh adanya endoreduplikasi DNA, fusi inti dan endomitosis. Sementara Bouman dan De-Klerk (2001) dan Borchert *et al.* (2007) melaporkan adanya aberasi sel, Cavallini dan Lupi (2006) dengan mosaik kromosom yang menjadi penyebab terjadinya mutasi ploidi atau proses poliploidi yang abnormal. Menurut Cox *et al.* (1998) perubahan-perubahan tersebut pada akhirnya menyebabkan terjadinya evolusi pada tanaman.

Media regenerasi berpengaruh terhadap daya regenerasi kultur antera kultivar Carnaval. Secara keseluruhan dua media regenerasi yang mampu meningkatkan kemampuan regenerasi kalus hingga berkembang membentuk tunas, yaitu MR-3 dan MR-7. Pada MR-3 tampak bahwa perubahan konsentrasi TDZ dari 0.5 mg/l menjadi 1.5 mg/l dan peningkatan NAA dari 0.01 mg/l menjadi 0.02 mg/l meningkatkan kemampuan media mendukung regenerasi kalus. Diduga kombinasi dan konsentrasi TDZ-NAA tersebut juga mempengaruhi kemampuan MR-7 dalam regenerasi kalus. Kombinasi konsentrasi hormon yang lebih kompleks pada MR-7 yang diharapkan memberikan hasil yang lebih baik ternyata memberikan hasil yang hampir sama dan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan MR-3.

Konsentrasi TDZ 1.5 mg/l dan 0.02 NAA pada modifikasi medium MMS (MR-3) diduga merupakan kombinasi konsentrasi hormon yang sesuai untuk kultur antera anthurium kultivar Carnaval. Pada studi lain, medium MS dengan 1 mg/l TDZ dan 0.1 mg/l NAA sesuai untuk induksi kaus dan perbanyak tunas pada kultur anther anyelir (Nontaswatsri *et al.*, 2007). Konsentrasi 1 mg/l 2,4-D dengan 0.1 mg/L TDZ pada medium MS dilaporkan paling sesuai untuk embriogenesis pada kultur antera kedelai (Wang *et al.*, 2003). Setengah MS dengan 5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l TDZ sesuai untuk penggandaan tunas pada anggrek (Lin *et al.*, 2000). Konsentrasi 5.4 μ M NAA and 0.4, 1.1 or 2.2 μ M TDZ sesuai untuk pembentukan embrio pada lili (Nhut *et al.*, 2001).

Perbanyakan dan regenerasi kalus umumnya dilakukan dengan mensub-kultur kalus pada media yang sama dengan media untuk induksinya (Lee dan Lee,

2003), tetapi pada penelitian ini media induksi kalus (MR-0) tidak sesuai untuk meregenerasi kalus menjadi tunas. Hasil ini diperkuat oleh hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rachmawati (2005) pada kultivar Tropical. Sub-kultur kalus dari media MR-0 ke media MR-3 dan/atau MR-7 meningkatkan kemampuan kalus untuk tumbuh, membentuk bakal tunas, dan tunas. Hasil ini menunjukkan bahwa tiap tahap pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* memerlukan media yang berbeda seperti yang dilaporkan pada anggrek (Lin *et al.*, 2000) dan kultur antera kedelai (Wang *et al.*, 2003). Pada anggrek setengah MS dengan 1 mg/l 2.4-D and 0.1 mg/l TDZ untuk pembentukan kalus, tetapi untuk regenerasi digunakan setengah MS dengan 1 mg/l 2.4-D dan 1 mg/l TDZ (Lin *et al.*, 2000). Pada kultur antera kedelai, 2 mg/l 2.4-D dengan 0.1 mg/l TDZ pada medium MS untuk induksi kalus, namun untuk embriogenesis menggunakan 1 mg/l 2.4-D dengan 0.1 mg/L TDZ (Wang *et al.*, 2003).

Peran TDZ dalam induksi dan regenerasi kalus pada kultur antera diduga berkaitan dengan kemampuannya dalam meningkatkan pembelahan sel eksplan. Menurut Murch dan Saxena (2001) TDZ berfungsi menginduksi pembentukan organ, melalui kemampuannya menjaga dan meningkatkan akumulasi auksin dalam sel eksplan. Auksin yang terakumulasi khususnya pada daerah yang dilukai selanjutnya akan menjadi sinyal penting dalam aktivitas dan pengaturan pembelahan sel, pemanjangan dan de-diferensiasinya (Bennett *et al.*, 1998). Diduga pengaruh yang hampir sama juga ditemukan dalam kultur antera anthurium. Akumulasi NAA dan auksin endogen yang terdapat dalam eksplan antera yang dipengaruhi oleh penambahan TDZ menstimulasi pembentukan kalus dan regenerasi tunas.

KESIMPULAN

Pembentukan kalus mulai terjadi \pm 2.7 bulan setelah kultur dan terlihat jelas 3.5 bulan setelah kultur. Jumlah rata-rata antera yang membentuk kalus adalah 3.6 per ulangan. Kalus kemerahan dan kuning teregenerasi dalam kultur antera. Kalus kemerahan memiliki kemampuan tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan kalus kuning. Kalus kemerahan yang dikultur pada MMS dengan 0.02 mg/l NAA dan 1.5 mg/l TDZ atau MMS dengan 0.25 mg/l 2,4-D, 0.02 mg/l NAA, 1.5 mg/l TDZ dan 0.75 mg/l BAP memberikan hasil terbaik dengan waktu muncul bakal tunas dalam minggu, jumlah bakal tunas per eksplan, dan tinggi bakal tunas dalam cm adalah 8.3-8.5, 10.3-10.8, 0.70-0.78 secara berurutan. Hasil ini menunjukkan bahwa antera kultivar Carnaval memiliki potensi untuk pengembangan metode kultur antera.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd Elaleem, K.G., R.S. Modawi, M.M. Khalafalla. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African J. Biotech. 8(11):2529-2534.
- Bennett M.J., A. Marchant, S.T. May, R. Swarup. 1998. Going the distance with auxin: unraveling the molecular basis of auxin transport. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 353:1511-1515.
- Borchert, T., J. Fuchs, T. Winkelmann, A. Hohe. 2007. Variable DNA content of *Cyclamen persicum* regenerated via somatic embryogenesis: rethinking the concept of long-term callus and suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 90:255-263.
- Bouman, H., G.J. De Klerk. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. Theor. App. Genet. 102(1):111-117.
- Cavallini, A., M.C. Lupi. 2006. Cytological study of callus and regenerated plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Breed. 99:203-238.
- Cox, A.V., J. G. Abdelnour, M.D. Bennett, I.J. Leitch. 1998. Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae) Am. J. Bot. 85(5):681-687.
- Duffy, B. 2000. Survival of the Anthurium blight pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, in field crop residues. European J. Plant Pathol. 106:291-295.
- Fu, X.P., S.H. Yang, M.Z. Bao. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant 44:194-202.
- Gunson, H.E., P.T.N. Spencer-Philips. 1994. Latent bacterial infections: epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. p.379-394. In P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, W.J. Davies (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Han, D.S., Y. Niimi, M. Nakano. 1997. Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic Irbid lily ‘Connecticut King’. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 47:153-158.
- Karam,N.S., M. Al-Majathoub. 2000. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. Sci. Hort. 86:323-333.
- Karami, O., K. Piri, R. Bahmani. 2009. Plant regeneration through callus cultures derived from immature-cotyledon explants of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) Trees – Struct. Funct. 23(2):335-338.
- Lee, Y.I., N. Lee. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. In Vitro Cell. Dev. Biol. & Plant. 39(5):475-479.
- Lin, Y.H., C. Chang, W.C. Chang. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 62(1):21-25.
- Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster, I Szarejsko. 2003. Double haploid production in crop plants: A Manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/ Boston/London. 428p.
- Mohan-Jain, S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118:153-166.
- Murch, S.J., P. K. Saxena. 2001. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium* × *hortorum* Bailey. Plant Growth Regul. 35:269-275, 2001.
- Nhut, D.T., B.V. Le, K.T.T. Van. 2001 Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. In vitro Cell Dev. Biol.& Plant 37:44-49.
- Nontaswatsri, C., S. Ruamrungsri, S. Fukai. 2007. Callus induction and plant regeneration of *Dianthus chinensis* L. and *Dianthus barbatus* L. via anther culture. ISHS Acta Horticulturae 788: International Workshop on Ornamental Plants. www.actahort.org/books/788/788_12.htm. Acces date 12 August 2009.
- Norman, Alvarez. 1994. Latent infections of in vitro anthurium caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39:55-61.
- Ockendon, D.J. 2008. The ploidy of plants obtained from anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis). Ann. App. Biol. 113(2): 319-325.

- Rachmawati, F. 2005. Kultur Antera pada Anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex André). Thesis. Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Rimberia, F.K., S. Adaniya, T. Etoh, Y. Ishimine. 2006. Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants. Euphytica 149:53-59.
- Saji, K.V., M. Sujatha. 1998. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica 103:1-7.
- Seguí-Simarro, J.M., F. Nuez. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. Cytogenet. Genome Res.120:358-369.
- Winarto, B., F. Rachmawati. 2007. Teknik kultur antera pada pemuliaan anthurium. J. Hort. 17(2):127-137.
- Wang, R.C, S.Y. Hsieh, M.S. Yeh. 2003. Studies on the anther culture of black soybean and vegetable soybean. Tainan District Agricultural Improvement Station, Research Bulletin 41:35-43.